TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DE MUFLONA (Ovis gmelini musimon) A OVEJA DOMÉSTICA

Santiago Moreno J., López Sebastián A ., González de Bulnes A., Cocero M.J., Gómez Brunet A., del Campo A., García García R.

Dpto. Reproducción Animal y Cons. Rec. Zoo. SGIT-INIA
Avda. Puerta de Hierro km 5,9. 28040 Madrid.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de tecnologías de transferencia de embriones de especies silvestres a domésticas puede contribuir a la protección de especies potencialmente en peligro de extinción (Coonrod et al., 1994), permitiendo incrementar la diversidad genética, reducir los intervalos generacionales y disminuir los riesgos de transmisón de agentes patógenos (Laskey et al., 1994). Además, la inmunidad pasiva conferida por el calostro permite una mayor supervivencia frente a enfermedades características de especies domésticas, en condiciones de cautividad o en ecosistemas en donde pueda haber un estrecho contacto entre animales silvestres y domésticos (Bunch et al., 1977). Sin embargo, los resultados de superovulación y fertilidad de embriones transferidos presentan, en la actualidad, unos rendimientos inferiores que en los animales domésticos (Schieve et al., 1991). La influencia del estrés en el manejo y la adecuación de los protocolos superovulatorios son factores determinantes en la eficacia de los tratamientos (Fernández Arias et al., 1997).

El muflón Europeo (*Ovis gmelini musimon*), muestra una estrecha relación genética con la oveja doméstica (Naitana et al., 1990). Recientes estudios citogenéticos han reforzado la hipótesis de que las actuales razas de ovinos domésticos tengan un origen común en el muflón (Hiendleder et al., 1998). Si bien, en la actualidad, el muflón no está clasificada oficialmente como especie en peligro de extinción, su estrecha relación filogenética con la oveja hacen considerarlo como un modelo experimental de interés, en estudios relacionados con la respuesta a tratamientos de superovulación, metodología del procedimiento quirúrgico y anestésico, para la recogida de embriones en rumiantes silvestres y su transferencia en especies domésticas compatibles.

MATERIAL Y METODOS

Sincronización y superovulación

Cinco hembras de muflón Europeo (4 - 9 años de edad) fueron utilizadas como donantes en el mes de Diciembre (dentro de su estación reproductiva). La sincronización se realizó con esponjas vaginales impregnadas con acetato de fluorogestona (40mg FGA) (Chronogest, Intervet) mantenidas durante 14 días, administrándose 100 µg de Cloprostenol (Estrumate, Pittman-Moore) en el día 12. Las esponjas fueron reemplazadas por unas nuevas el día 9 del tratamiento progestativo. La superovulación se ha inducido con FSH-o (FSH ovina, Ovagen®, ICP), administrada en 7 dosis decrecientes vía i.m., comenzando 60 horas antes de la retirada de la esponja, a intervalos de 12 horas: 1.25ml:1.25ml, 1.25 ml:1ml, 1ml:1ml, 1ml.

El grupo de receptoras estaba constituido por 8 ovejas de raza Merina (2-6 años de edad), a las que se retiró la esponja al mismo tiempo que las receptoras, a la vez que se aplicó una inyección

intramuscular de 300/350 UI de eCG, en función del peso. El día anterior a la transferencia de embriones se les realizó una ecografía transrectal (7.5 Mhz) para la valoración del número y calidad de cuerpos lúteos y se recogió una muestra de sangre para la determinación de los niveles plasmáticos de progesterona, lo que sería utilizado como criterio para la selección de ovejas para la transferencia .

Cubriciones

Las hembras donantes fueron cubiertas por monta controlada, con 6 machos de muflón, a partir de las 24 horas de la retirada de la esponja, recibiendo cada muflona al menos 2 saltos.

Anestesia

Los animales se mantuvieron en ayuno durante las 24 horas previas a la recogida y transferencia de embriones. Se anestesiaron mediante una asociación de 2mg/kg de Ketamina (Imalgene-1000®, Rhône Mérieux) y 100µg/kg de Medetomidina (Domtor®, Pfizer) por vía i.m. A los 5 - 11 minutos de la inyección de la combinación anestésica, las muflonas presentaban un buen estado de inmovilización y analgesia que se mantuvo durante la intervención quirúgica. El estado de anestesia se valoró en función de la ausencia de respuesta a estímulos, reflejo palpebral, relajación muscular y respuesta al dolor. La frecuencia cardiaca fue normal durante todo el periodo de anestesia (72-128 lat/min), siendo apreciable una ligera taquipnea (68-84 resp/min). El estado anestésico era revertido mediante 0,25mg/kg de Atipamezol (Antisedan®, Pfizer) por vía i.m., recuperando su estado normal a los 4 - 8 minutos de su administración.

Obtención y transferencia

Previa observación laparoscópica de la tasa de ovulación, los embriones se obtuvieron mediante laparotomías medianas, el día 8 después de la retirada de la esponja. Los embriones se extrajeron por perfusión de ambos cuernos uterinos con PBS-Dulbeccos suplementado con 0.2% BSA. Se transfirieron 2 embriones, por vía quirúrgica, en el tercio anterior del cuerno ipsilateral al ovario con mayor número y mejor calidad de cuerpos lúteos. Los embriones fueron transferidos con un intervalo de 1 a 3 horas desde su extracción.

Diagnóstico de gestación

Se realizó por ecografía con sonda trans-abdominal de 5MHz, el dia 33 después de la transferencia de embriones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las muflonas presentaban síntomas de celo entre las 36 - 48 horas (41.4 ± 3.6 horas) después de la retirada de las esponjas. De las 5 muflonas tratadas, 3 presentaron respuesta superovulatoria (6 -8 cuerpos lúteos), apreciándose en las 2 restantes ovulaciones simples. La tasa de ovulación (x ± d.s), porcentaje de recogida y de viabilidad embrionaria en las muflonas que superovularon eran 7.3 ± 1.1, 63.6% y 71.4%, respectivamente. La tasa de ovulación era similar a la decrita por Ledda et al. (1995), en muflonas nacidas en cautividad y superovuladas dentro de su estación reproductiva mediante FSH-p. Los embriones recogidos y transferidos por donante (x ± d.s) eran 4.6 ± 1.5 y 3.3 ± 1.5, respectivamente. El porcentaje de embriones recogidos era inferior al que se indica en la especie doméstica (López Sebastián et al., 1990), pero superior al descrito por Bunh et al. (1977) en muflonas superovuladas con PMSG. Un problema común en los tratamientos superovulatorios de especies silvestres es la presencia de cuerpos lúteos avasculares (Loskutoff et al., 1990). Ledda et al. (1995) han sugerido que el estrés repetido inducido por la inmovilización requerida para el tratamiento en muflonas puede ser responsable de la regresión

luteal temprana. Aunque no se observaron regresiones luteales tempranas en ninguna de las donantes, el bajo porcentaje de recuperación obtenido puede estar determinado por una aceleración del transporte tubárico del embrión y expulsión a través del cervix, inducido por el estrés. Más estudios son necesarios para optimizar los rendimientos de tasa de ovulación y de porcentaje de recogida de embriones en esta especie.

La calidad y número de cuerpos lúteos en las receptoras determinan una buena tasa de gestación. Del grupo inicial de receptoras, se seleccionaron 5 ovejas, en función del número y calidad de los cuerpos lúteos tras la observación ecográfica, y de los niveles de secreción de progesterona. El número medio de cuerpos lúteos por receptora fue de 2.2 ± 0.8, con una concentración media de progesterona plasmática de 2.8 ± 1.1 ng/ml. La ecografía transabdominal, a los 33 días después de la transferencia, mostraba una tasa de gestación del 80% (4/5) de las que dos ovejas presentaban gestaciones dobles.

En relación al procedimiento anestésico utilizado, el buen estado de inmovilidad y analgesia inducido mediante la asociación anestésica de medetomidina y ketamina a las dosis utilizadas, hacen recomendable su uso en esta especie silvestre. La medetomidina presenta una mayor acción anestésica disociativa que la xilacina, y permite reducir la dosis efectiva de la ketamina cuando es utilizada en asociación (Jalanca y Roeken, 1990). Además, presenta la ventaja de la rápida recuperación del animal mediante la administración antagonistas α-2-adrenérgicos (Atipamezol), previniéndose complicaciones debidas a meteorismo e hipotermia (Fournier et al., 1998).

BIBLIOGRAFÍA

Bunch T.D., Foote W.C., Whitaker B. 1977. *J. Wild. Manage.* 41: 726-730

Coonrod S.A., Flores-Foxworth G., Moreno J.F., Westhusin M., Byrd S.R. 1994. *Theriogenology* 41:182 (Abst.)

Fernández Arias A., Folch J., Alabart J.L., Ramón J., Villalta M. 1997. *Theriogenology* 47: 171 (Abst).

Fournier P., Fournier-Chambrillon C., Christophe Vié J. 1998. *J. Zoo Wild. Med.* 29: 190-194

Hiendleder S., Mainz K., Plante Y., Lewalski H. 1998. *J. Heredity.* 89:113-120.

Jalanca H.H., Roeken B.O. 1990. *J. Zoo. Wild. Med.* 21: 259-282.

Laskey B.L., Loskutoff N.M., Anderson G.B. 1994. *Theriogenology* 41: 119-132.

Ledda S., Naitana S., Loi P., Dattena M., Gallus M., Branca A., Cappai P. 1995. *Anim Reprod. Sci.* 39: 09-117.

López Sebastián A., Cognie Y., Cocero M.J., de la Fuente J., Poulin N. 1990. *Theriogenology*, 34: 175-180.

Loskutoff N.M., Raphael B.L., Nemec L.A., Wolfe B.A., Howard J.G., Kraemer D.C. 1990. *J. Reprod. Fertil.*, 88:521-532.

Naitana S., Ledda S., Cocco E., Manca L., Masala B. 1990. *Anim. Genet.* 21: 67-75.

Schieve M.C., Bush M., Phillips L.G., Citino S., Wildt D.E. 1991. *J. Exper Zool.*, 58: 75-88.

Agradecimientos: a Pfizer por el cesión del Domtor® y Antisedan®